

***Bacteroides fragilis* csoportba tartozó magyarországi klinikai izolátumok  
epidemiológiai és antibiotikum érzékenységi vizsgálata**

**Ph. D. disszertáció tézisei**

**Dr. Sárvári Károly Péter**

**Témavezető:**

**Dr. Urbán Edit Ph. D.**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Interdiszciplináris Orvostudományok**

**Doktori Iskola**



**Szegedi Tudományegyetem**

**Általkános Orvostudományi Kar**

**Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet**

**2017**

**Szeged**

## TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
I. BEVEZETÉS	3
I.1. <i>BACTEROIDES</i> NEMZETSÉG	3
I.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT ÉS SURVEILLANCE JELENTŐSÉGE	4
II. CÉLKITÚZÉSEK	4
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	5
III.1. MALDI-TOF MS MÓDSZER VALIDÁLÁSA	5
III.1.1. BAKTÉRIUMTÖRZSEK	5
III.1.2. MALDI-TOF MS MÓDSZER	5
III.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT	5
III.3. MULTIDRUG REZISZTENS TÖRZSEK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA	6
III.4. <i>B. FRAGILIS</i> ENTEROTOXIN GÉN ÉS IZOTÍPUSAINAK, VALAMINT A C10 ÉS C11 CISZTEIN PROTEÁZ GÉNEK VIZSGÁLATA	6
IV. EREDMÉNYEK	7
IV.1. MALDI-TOF MS MÓDSZER VALIDÁLÁSA	7
IV.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT	7
IV.3. MULTIDRUG REZISZTENS TÖRZSEK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA	8
IV.4. ENTEROTOXIN GÉN ÉS IZOTÍPUSAINAK, VALAMINT A C10 ÉS C11 CISZTEIN PROTEÁZ GÉNEK VIZSGÁLATA	8
V. MEGBESZÉLÉS	9
V.1. MALDI-TOF MS MÓDSZER VALIDÁLÁSA	9
V.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT	9
V.3. MULTIDRUG REZISZTENS TÖRZSEK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA	10
V.4. ENTEROTOXIN GÉN ÉS IZOTÍPUSAINAK, VALAMINT A C10 ÉS C11 CISZTEIN PROTEÁZ GÉNEK VIZSGÁLATA	10
VI. KÖVETKEZTETÉSEK	11
HIVATKOZÁSOK	12
A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK	14
A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	14
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	15

## I. BEVEZETÉS

### I.1. *BACTEROIDES* NEMZETSÉG

Az emberi szervezet testfelszínein és egyes szerveiben található mikroorganizmusok közösségét korábban normál flórának nevezték, ma azonban a velünk élő, betegséget nem okozó mikrobiális közösséget, amelynek fajgazdagságát ma több tanulmány vizsgálja, humán mikrobiomnak nevezzük. A bél mikroba flórája 500-100 különböző baktériumfajból áll, amelynek kb. 99,9%-a obligát anaerob baktérium [1] és ezek mintegy 25%-a *Bacteroides* nemzetségbe tartozik [2]. A nemzetségen belül a leggyakrabban izolálható fajok a *B. fragilis* csoportot alkotják. Ezen baktériumok bizonyos élettani szerepük mellett mint opportunistáknak képesek súlyos fertőzéseket is okozni. Az általuk okozott infekciók általában polimikrobiálisak, melyekben fakultatív és obligát anaerob baktériumok egyszerre mutathatók ki. Közülük a *B. fragilis* tenyésztethető ki leggyakrabban és a mortalitás meghaladja a 19%-ot, bár a flóra mindössze 0,5%-át teszi ki. [2]. A *B. fragilis* csoport törzsei által okozott legsúlyosabb fertőzések: hasúri tályogok, appendicitis gangrenosa, nőgyógyászati, bőr- és légyszöveti infekciók, agytályog és szepszis. [2]. *Bacteroides* izolátumok gyakran kitenyésztethők ovarium-, petevezeték- és Bartholin-mirigy tályogokból, a *B. thetaiotaomicron* a kismencedei gyulladásos betegségben (PID) tölt be patogén szerepet [2]. A *Bacteroides* törzsek csak ritkán okoznak központi idegrendszer infekciókat (agytályog, subdurális vagy epidurális empyema és meningitis), endocarditist és pericarditist [2,3]. A bacteroidesek okozta szeptikus arthritis és osteomyelitis gyakran haematogén úton alakul ki, protézis, rheumatoid arthritis és trauma hajlamosítanak ezekre a kórképekre. [2].

### I.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT ÉS SURVEILLANCE FONTOSSÁGA

Az anaerob baktérium-ellenes antibiotikumok száma eléggé korlátozott: cephamycinek (pl. cefoxitin),  $\beta$ -laktám/ $\beta$ -laktamáz gátló kombinációk, karbapenemek, 5-nitroimidazolak, erythromycin, clindamycin, tigecyclin, chloramphenicol, fluorokinolonok. Az anaerob baktériumok körében az antibiotikum érzékenységi vizsgálatot rutinszerűen nem ajánlja a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Magyarországon eddig csak kevés olyan tanulmányt publikáltak, mely a *B. fragilis* csoport antibiotikum érzékenységi adatait vizsgálta [4,5]. Az irodalmi adatok alapján az

antibiotikumok elterjedt használata miatt az anaerob törzsek között is megjelentek az MDR izolátumok.

## II. CÉLKITÚZÉSEK

Kevés tanulmány jelent meg eddig, amely a *B. fragilis* csoport izolátumainak antibiotikum érzékenységi adatait vizsgálja. Ezek a tanulmányok a klinikailag releváns *B. fragilis* csoport izolátumai körében emelkedő rezisztenciát mutatnak egyes antibiotikumokkal szemben, azonban jelentős földrajzi eltérés tapasztalható az adatok között. Az antibiotikumok elterjedt használata MDR *Bacteroides* törzsek megjelenéséhez vezetett; tanulmányunk az első, amely egy átfogó vizsgálat keretében az MDR *Bacteroides* törzsek jelentős halmozódását igazolta Magyarországon. Az elmúlt két évtizedben nem publikáltak antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat az anaerob baktériumok körében. A *B. fragilis* törzsek enterotoxin termelésére is képesek, a toxin termelését a *bft* gén kódolja, a gén- és izotípusainak előfordulását klinikai izolátumokban már korábban vizsgálták Magyarországon, hagyományos szövettoxicitási és molekuláris biológiai módszerekkel. Azonban a nemzetközi irodalomban is kevés adat érhető el a *bft* gén és izotípusainak megoszlását illetően, együttes előfordulásukat a C10 és C11 cisztein proteáz (*bfp1-4*, *fpn*) és a *cfiA* génekkel még csak néhány tanulmány vizsgálta.

Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. A MALDI-TOF MS módszer validálása különböző, *B. fragilis* csoportba tartozó izolátumok species szintű identifikálására.
2. Magyarország különböző területeiről származó 400, klinikailag releváns *B. fragilis* csoportba tartozó izolátum antibiotikum érzékenységének epidemiológiai vizsgálata, majd az adatok összehasonlítása az előző hazai, illetve a nemzetközi adatokkal.
3. Az MDR izolátumok antibiotikum rezisztencia génjeinek és egyéb genetikai elemeinek molekuláris vizsgálata.
4. A 200 *B. fragilis* törzs enterotoxin gén (*bft*) jelenlétének, ezek izotípusainak, valamint a C10 és C11 cisztein proteáz gének (*bfp1-4*, *fpn*) meghatározása.

### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### III.1. MALDI-TOF MS MÓDSZER VALIDÁLÁSA

##### III.1.1. BAKTÉRIUM TÖRZSEK

400 *B. fragilis* csoportba tarozó izolátumot vizsgáltunk, amelyeket 2014 és 2016 között négy hazai klinikai mikrobiológiai laboratóriumban (1. centrum: Semmelweis Egyetem, Budapest, 2. centrum: SYNLAB Kft., Budapest, 3. centrum: Debreceni Egyetem, 4. centrum: Szegedi Tudományegyetem) gyűjtöttek. A Pécsi Tudományegyetemről kapott tíz törzset együtt vizsgáltuk az 1. centrum izolátumaival. A gyűjtés kritériuma: az adott időszakban az első 100, klinikailag releváns törzs, betegenként egy speciesből izolátum. A törzseket -80 °C-on, 20%-os glycerol tartalmú Brain Heart Infusion (BHI) oldatban tároltuk. Minden vizsgált törzset Schaedler agaron (bioMérieux, France) 48 órán át, 37 °C-on, anaerob kamrában tenyésztettük.

##### III.1.2. MALDI-TOF MS

A törzseket minden centrum saját maga is identifikálta a saját MALDI-TOF készülékével, majd minden törzset újra identifikáltuk MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, Germany) készülékkel, Biotyper Version 3.0 szoftver segítségével. Vizsgálataink során találtunk 21 olyan törzset, amelyek esetén a MALDI-TOF MS módszerrel az identifikálás és újra identifikálás során ellentmondásos eredményt kaptunk, ezeket megvizsgáltuk Rapid ID 32A (bioMérieux, Fr.) biokémiai teszttel, majd a törzsek 16S rRNS génjét RT-PCR-rel amplifikáltuk és a termékeket szekvenáltattuk. A kapott szekvenálási eredményeket NCBI BLAST és leBiBi szoftverekkel elemeztük. *B. fragilis* ATCC 25285 és *B. thetaiotaomicron* ATCC 29742 törzseket használtunk kontrollként.

#### III.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT

Meghatároztuk a törzsek minimális gátló koncentrációját (MIC) tíz antibiotikummal szemben a CLSI ajánlása alapján [6]: ampicillin, amoxicillin/klavulánsav, cefoxitin, meropenem, clindamycin, metronidazol, moxifloxacin, tetracyclin, tigecyclin és chloramphenicol. A MIC-értékek interpretálása a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), illetve ahol nincs még európai breakpoint a CLSI határértékei alapján történt [6,7]. Mivel a tigecyclin esetén még nem állnak rendelkezésre

határértékek, ezért Nagy E. és *mtsai* által közölt határértékeket alkalmaztuk [5]. *B. fragilis* ATCC 25285 és *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 törzseket használtunk kontrollként.

### III.3. MULTIDRUG REZISZTENS TÖRZSEK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során hat MDR törzset találtunk. A *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermB*, *ermG*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*, *bexA*, *gyrA* géneket és IS4351 elemet RT-PCR vizsgálattal mutattuk ki a *cfiA*, *cfxA* gének és IS4351 upstream régióját end-point PCR módszerrel, ahogyan Eitel Zs. és *mtsai* korábban leírták [8]. Az SZ38 jelű *B. fragilis* *gyrA* génjének amplikonját tisztítottuk és szekvenáltattuk ABI BigDye® Terminator Version 3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) kittel, Series Genome Analyser 3500 (Life Technologies, USA) készülékkel, melyet részletesen jellemeztünk.

### III.4. *B. FRAGILIS* ENTEROTOXIN GÉN ÉS IZOTÍPSAINAK, A C10 ÉS C11 CISZTEIN PROTEÁZ GÉNEK JELENLÉTÉNEK VIZSGÁLATA

200 *B. fragilis* törzsben határoztuk meg RT-PCR módszerrel a *bft* gén jelenlétét *bftF* és *bftR* primerek felhasználásával, ahogyan Sóki J. és *mtsai* korábban leírták [9]. A izotípusok meghatározására a gén belső fragmentjét amplifikáltuk és olvadáspont-analízist végeztünk. Ezeket a PCR-termékeket megtisztítottuk és RFLP-vel vizsgáltuk a *bft* izotípusainak elkülönítése céljából. A *bft-1* és *bft-2* izotípusok RT-PCR olvadáspont-analízis segítségével történt elválasztását három-három *bft-1* és *bft-2* izolátum *bft* génjének belső fragmentum szekvenálásával konfirmáltuk. A C10 és C11 cisztein proteáz gének (*bfp1-4* és *fpn*) prevalenciájának meghatározása céljából 26 *bft*-pozitív és 46 *bft*-negatív *B. fragilis* törzset vizsgáltunk RT-PCR módszerrel.

## IV. EREDMÉNYEK

### IV.1. MALDI-TOF MS MÓDSZER VALIDÁLÁSA

A 400 törzs identifikálása és újra-identifikálása során 379 (94,75%) törzs esetén volt az identifikálás fajsztintű,  $\geq 2.000$  log score értékű (log score tartomány: 2,020–2,525; átlagos log score: 2,249). A MALDI-TOF MS módszerrel történt, három párhuzamos újra-identifikálás során a legjobb log score értékeket választottuk ki. Huszonegy (négy

*B. fragilis* és 17 nem fragilis *Bacteroides*) nem egyező újra-identifikálási eredménnyel rendelkező törzs esetében elvégeztük az identifikálást a hagyományos biokémiai módszeren alapuló Rapid ID 32A (bioMérieux, Fr.) gyári identifikáló módszerrel. A törzsek PCR után nyert 16S rRNS gén amplikonjait megszekvenáltattuk és elemeztük. A MALDI-TOF MS módszerrel és a szekvenálással 15 esetben (71,42%; 15/21) kaptunk egyező eredményt. Csak nyolc törzs (38,1%; 8/21) esetén kaptunk kiváló (>95.0%) azonosítási eredményt a Rapid ID 32A módszerrel. MALDI-TOF MS és a Rapid ID 32A módszereket összehasonlítva csak öt esetben kaptunk egyező eredményt (5/21, 23.81%).

#### IV.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT

A vizsgált törzsek 98,0%-a rezisztens volt ampicillinre, csak 4,5% mutatott rezisztenciát az amoxicillin/klavulánsavval szemben. A cefoxitin rezisztens törzsek aránya 6,75%; viszonylag magas volt a meropenem rezisztens (7,0%) törzsek aránya. Clindamycinnel szemben az izolátumok 36,75% -a volt rezisztens. A metronidazol hatékony maradt a *Bacteroides* fajokkal szemben, egy rezisztens törzset találtunk. A moxifloxacin rezisztens törzsek aránya összesen 18,5% volt. A CLSI határértékek alapján tetracyclinnel szemben a törzsek 65,25% volt rezisztens, azonban az izolátumok 94,75%-a érzékeny volt tigecyclinnel szemben, egyetlen törzs sem volt rezisztens chloramphenicolal szemben. A cefoxitin rezisztens törzsek aránya jelentős eltérést mutat a 3. és 4. centrum között (3. centrum: 3,0% 4. centrum: 13,0%) ( $p < 0.001$ ). Viszonylag magas meropenem rezisztenciát észleltünk a 4. centrumban: 11 meropenem rezisztens *B. fragilis* és egy *B. ovatus* törzset azonosítottunk, míg a többi centrumban ez az arány alacsonyabb volt (4,0-7,0%). A clindamycin rezisztens törzsek viszonylag jelentős földrajzi eltérést mutatnak, amely szignifikáns volt az 1. és a 4. centrum között (1. centrum: 48,0%, 4. centrum: 27,0%) ( $p = 0.003$ ).

#### IV.3. MULTIDURG REZISZTENS *BACTEROIDES* TÖRZSEK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

Egy MDR törzset izoláltunk a debreceni (*B. ovatus* D92) és ötöt a szegedi centrumból (*B. vulgatus* SZ4, SZ34, *B. ovatus* SZ9, *B. thetaiotaomicron* SZ35 és *B. fragilis* SZ38). Az izolált MDR törzsek négy-hat különböző antibiotikum csoport tagjaival szemben mutattak rezisztenciát. A *B. fragilis* SZ38 tartalmazta a *cfiA* gént, de az upstream régióban

hiányzott az IS-elem, egyik törzs sem bizonyult *cepA* gén pozitívnak, három izolátumban azonosítottuk a *cfxA* gént (*B. vulgatus* SZ4, *B. ovatus* SZ9 és *B. thetaiotaomicron* SZ35). A *B. ovatus* D92 törzs hordozta az *ermG*, a *B. vulgatus* SZ4 és *B. thetaiotaomicron* SZ35 törzsek az *ermF* gént, míg a *B. ovatus* SZ9 törzs mindkettőt. A *B. vulgatus* SZ4 és *B. thetaiotaomicron* SZ35 törzsekben kimutattuk a teljes hosszúságú IS4351 elemet. Minden izolátum tartalmazta a *tetQ* gént, közülük három mutatott magas szintű tetracyclin rezisztenciát (MIC $\geq$ 32 mg/l). Egyik izolátumban sem detektáltuk a *nim* gént; a *B. thetaiotaomicron* SZ35 hordozta a *bexA* efflux gént. A *B. fragilis* SZ38 izolátum *gyrA* génjének pontmutációját vizsgáltuk, szekvencia-analízis során a giráz enzim GyrA alegységének QRDR régióban Ser82Phe szubsztitúciót azonosítottunk.

#### **IV.4. *B. FRAGILIS* ENTEROTOXIN GÉN ÉS IZOTÍPSAINAK, VALAMINT C10 ÉS C11 CISZTEIN PROTEÁZ GÉNEK VIZSGÁLATA**

RT-PCR módszerrel a 200 *B. fragilis* izolátum közül 26 (13,0%) esetén igazoltuk *bft* gén előfordulását. PCR-RFLP-vel különítettünk el az izotípusokat: 20 *bft-1* és hat *bft-2* izotípust, *bft-3* izotípust hordozó izolátumot nem találtunk. A *bft-1* és -2 izotípusok olvadáspont-analízisével kapott eredmények jó korrelációt mutatnak a PCR-RFLP kapott eredményekkel. A *bfp1-4* (C10 proteáz) és *fpn* (C11 proteáz) gének jelenlétének vizsgálatát 72 *B. fragilis* (26 ETBF és 46 nem ETBF) törzzsel végeztük el. Harmincnycolc törzs tartalmazta a *bfp1*, míg 58 a *bfp2*, illetve 17 a *bfp3* géneket, egyik sem tartalmazta a *bfp4*-et. Kilenc törzs hordozta egyidejűleg a *bfp1*, *bfp2* és *bfp3* géneket; 22 a *bfp1* és a *bfp2* géneket; öt izolátum volt pozitív a *bfp2* és *bfp3* génekre; egy törzs hordozta a *bfp1* és *bfp3* géneket. A 26 *bft*-pozitív *B. fragilis* törzs közül 24 tartalmazta az *fpn* gént (92,3%); a 46 *bft*-negatív izolátumból 36 (78,3%) tartalmazta az *fpn* gént. A *cfiA*-pozitív izolátumok közül három volt pozitív *bfp1* génre, kettő *bfp3* génre; a *cfiA*-negatív törzsek közül 35 volt pozitív *bfp1*, 56 *bfp2* és 17 for *bfp3* génre. Szignifikáns negatív korrelációt állpítottunk meg a *cfiA* és *fpn* (p<0.000) gének között.



## V. MEGBESZÉLÉS

### V.1. MALDI-TOF MS MÓDSZER VALIDÁLÁSA

A biokémiai aktivitáson alapuló Rapid ID 32A (bioMérieux, Fr.) módszer adatbázisa meglehetősen szűk spektrumú, állandó fejlesztést kíván, bővíteni kell az újonnan felfedezett speciekkel. A biokémiai tesztek hátránya még, hogy az aszacharolitikus aktivitású, biokémiaiilag inaktív törzsek meghatározása nehézkes. A 16S rRNS gén szekvenálása a legpontosabb módszer, de bonyolult, idő- és műszerigényes volta miatt nem alkalmazzák a hazai rutin klinikai mikrobiológiai gyakorlatban. A MALDI-TOF MS módszer forradalmasította és egyszerűsítette a klinikai izolátumok identifikálását. A módszer rövid idő alatt, könnyen kivitelezhető, reprodukálható és elkülönítési potenciálja magasfokú. A *Bacteroides* törzsek 94,75%-át sikerült species szinten azonosítani a Biotyper 3.0 szoftver segítségével. A MALDI-TOF MS és 16S rRNS gén szekvenálása során a *Bacteroides* SY9, SY64 és SY81 törzsek esetén kapott eltérő eredmények valószínű magyarázata az, hogy a speciek filogenetikailag ugyanabba a csoportba tartoznak.

### V.2. ANTIBIOTIKUM ÉRZÉKENYSÉGI VIZSGÁLAT

Vizsgálataink során magas ampicillin rezisztencia arányt (98,0%) találtunk, amely a *Bacteroides* izolátumok körében széles körben elterjedt  $\beta$ -laktamázoknak köszönhető [6]. A törzsek mindössze 4,5%-a volt rezisztens amoxicillin/klavulánsavra, azonban korábbi időszakban Nagy és *mtsai* 8,7%-os arányt közöltek [6]. 6,75%-os volt a cefoxitin rezisztens izolátumok aránya, amely sokkal alacsonyabb, mint amelyet korábbi tanulmányokban közöltek (15,2-17,2%) [6,10]. A vizsgálatunk 7,0%-os meropenem rezisztenciát igazolt, ugyanakkor egy amerikai tanulmány 0,5%-os rezisztencia arányt írt le a *B. fragilis* csoport izolátumai körében [11]. Clindamycinnel szemben a törzsek 36,75%-a mutatott rezisztenciát, amely fajonkénti eltérést mutat, más szerzők ezt az arányt 27-37,6%-nak találták [5,12]. Vizsgálataink során egy metronidazol rezisztens törzset azonosítottunk (0,25%), tetracyclinnel szemben a törzsek 65,25%-a volt rezisztens, míg a tigecyclin nagyon hatékony volt, törzsek csak 1,5%-a mutatott rezisztenciát, amely egyezik Nagy és *mtsai* által közölt eredménnyel (1,7%) [5]. A chloramphenicol hatákonysága kiváló maradt (nem találtunk rezisztens törzset), Wybo és *mtsai* is 99%-os érzékenységet közöltek 2004-ben [12]. A Nagy és *mtsai* által közölt eredményekkel összehasonlítva a clindamycin

rezisztens törzsek aránya 23%-ról 36,75%-ra, a moxifloxacin rezisztencia 13,6%-ról 18,5%-ra emelkedett, de érdekes módon az amoxicillin/klavulánsavval szembeni rezisztencia 15%-ról 4,5%-ra, a cefoxitiné 24%-ról 6,75%-ra csökkent [4,5].

### V.3. MULTIDRUG REZISZTENS TÖRZSEK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA

Hat MDR izolátumot találtunk, amely négy-hat különböző antibiotikum csoport tagjaival szemben mutatott rezisztenciát. Az MDR törzsek rezisztencia mechanizmusainak molekuláris háttere izolátumonként eltérő. Magyarországon eddig csak egyetlen MDR *B. fragilis* írtak le eddig Urbán és *mtsai*, amely rezisztens volt penicillin, amoxicillin/klavulánsav, piperacillin/tazobactam, cefoxitin, meropenem, clindamycin és tetraciklin antibiotikumokkal szemben, amely *cepA*, *cfiA*, *erm*, *nimA*, *tetQ* géneket és az *IS1187* elemet hordozta [9].

### V.4. *B. FRAGILIS* ENTEROTOXIN GÉN ÉS ISOTÍPUSAINAK, VALAMINT A C10 ÉS C11 PROTEÁZ GÉNEK VIZSGÁLATA

Adataink alapján a vizsgált törzsek többsége *bft-1* allélt (76,9%, 20/26) hordozott, 23,1% (6/26) tartalmazta a *bft-2* izotípust és nem találtunk *bft-3*-pozitív törzs Scotto d'Abusco és *mtsai* közölték, hogy intestinális és extraintestinális ETBF törzsek között a leggyakoribb izotípus a *bft-1* (62,5%, 10/16), 25,0% (4/16) hordozta a *bft-2*-t és 12,5% (2/16) volt pozitív *bft-3*-ra [13]. A *bft*-pozitív és –negatív *B. fragilis* törzsek között a *bfp2* gén a leggyakoribb és pozitív korreláció volt megállapítható a *bfp2* és *fpn* gének között. Az összesen 26 *bft*-pozitív törzs közül 24-ben volt kimutatható az *fpn* gén, mely fontos szerepet tölt be a *B. fragilis* enterotoxin aktiválásában. Ugyanakkor 36 *bft*-negatív *B. fragilis* izolátum szintén hordozta az *fpn* gént. Nagyjából azonos nagyságú *bft*-hordozó törzset találtunk (13,0%), mint 2006-os korábbi tanulmányunkban (8,7%) [14]. Intézetünkben az első vizsgálatok során magasabb, 25,3%-os *bft* hordozási arányt állapítottak meg, ekkor azonban még nem molekuláris diagnosztikai módszereket használtak, hanem specifikus szövettotoxicitási vizsgálatokat HT29/C1 sejtkultúrán [15].

## VI. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Klinikailag releváns, *B. fragilis* csoportba tartozó izolátumok MALDI-TOF MS módszerrel történő identifikálását validáltuk. A MALDI-TOF MS módszerrel három mérést végeztünk

el, majd az eredményeket összehasonlítottuk. Nem egyező eredmények esetében 16S rRNS gén szekvenálást végeztünk. A MALDI-TOF MS módszer nagy pontosságú (94,75%), fajszintű identifikálásra alkalmas a *B. fragilis* csoport törzsei esetén. Vizsgálataink a MALDI-TOF MS módszer validálása során a módszer magas fokú specificitását, jó reprodukálhatóságát, megbízhatóságát igazolták a hagyományos és automatizált biokémiai tesztekkel szemben.

2. Kutatásaink során Magyarországon elsőként végeztünk olyan prospektív, tudományos igényű antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat az anaerob baktériumok (*B. fragilis* csoport tagjai) között, amely egységes kritériumokkal és azonos módszerrel történt. Az antibiotikum érzékenységi adatokat értékeltük és összehasonlítottuk nemzetközi és korábbi hazai adatokkal. A tanulmány magas fokú ampicillin rezisztenciát igazolt, azonban csak a törzsek 4,5%-a volt rezisztens amoxicillin/klavulánsavra. A cefoxitin, tetracyclin és moxifloxacin rezisztens izolátumok aránya fajonként eltérő volt. A meropenem esetén viszonylag magas rezisztencia arányt állapítottunk meg (7,0%), a *B. fragilis* törzsek 8,58%-a hordozta a *cfiA* gént. Az előző adatokhoz képest emelkedett a clindamycin rezisztens törzsek aránya (36,75%), amely azonban fajonként eltérő volt. A metronidazol, tigecyclin és chloramphenicol még mindig megtartották hatékonyságukat a *Bacteroides* izolátumok ellen.
3. Az MDR *Bacteroides* törzsek jelentős halmozódását figyeltük meg (hat MDR törzs a 400 *Bacteroides* izolátum közül), amelyek négy-hat különböző antibiotikum csoport tagjaival szemben mutattak rezisztenciát. A részletes molekuláris biológiai vizsgálataink alapján ezen MDR izolátumok antibiotikum rezisztencia mechanizmusainak molekuláris háttere törzsenként eltérő volt.
4. A *B. fragilis* törzsekben megvizsgáltuk *bft* gén-, a C10 and C11 cisztein proteáz és *cfiA* gének incidenciáját. A törzsek 13,0%-a hordozta a *bft* gént, amely nem mutat szignifikáns eltérést a 2006-ban közölt adatainkkal (8,7%). A vizsgált *bft*-pozitív törzsek többsége a *bft-1* allélt, 23,1%-a *bft-2* allélt hordozta, nem találtunk *bft-3*-pozitív izolátumot. Egy olyan, ritkán izolált, *B. fragilis* törzset is azonosítottunk, amely egyidejűleg hordozta a *cfiA* és *bft*

géneket. A *bft*-pozitív törzsek között 24 tartalmazta egyidejűleg a *B. fragilis* enterotoxin aktiválásában szerepet játszó fragipain termelődéséért felelős *fpn* gént it.

Legfontosabb következtetésünk az, hogy az időszakonként végzett antibiotikum érzékenységi vizsgálat a *Bacteroides* fajok körében is rendkívül fontos abból a célból, hogy pontos helyi és nemzeti antibiotikum rezisztencia adatokat nyerjünk, amely kulcs fontosságú a betegek megfelelő antibiotikum terápiájának kiválasztásában.

## HIVATKOZÁSOK

1. Xu J., Gordon J. I.: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(18):10452-10459
2. Wexler H. M.: *Bacteroides*: the good, the bad and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(4):593-621
3. Brook I.: Meningitis and shunt infection caused by anaerobic bacteria in children. *Pediatr Neurol* 2002;26(2):99-105
4. Nagy E., Szőke I., Gacs M., Csiszár K.: Antibiotic susceptibility of *B. fragilis* group strains in Hungary. *Anaerobe* 1995;1:269-274
5. Nagy E., Urbán E., Nord C. E. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:371-379.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23<sup>rd</sup> informational supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: CLSI, 2013
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical Breakpoints v. 7. 1., 2017
8. Eitel Zs., Sóki J., Urbán E., Nagy E.: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe* 2013;21:43-49
9. Urban E., Horvath Z., Soki J., Lázár Gy.: First Hungarian case of an infection caused by multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* strain. *Anaerobe* 2015;31:55-58
10. Karlowsky J. A, Walkty A. J, Adam H. J., Baxter M. R., Hoban D. J., Zhanel G. G.: Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD surveillance study. *Antimicrob Agents Ch* 2012;56(3):1247-1252
11. Snyder D. R., Jacobus N. V., McDermott L. A., Ruthazer R., Golan Y., Goldstein E. J., Finegold S. M., Harrell L. J., Hecht D. W., Jenkins S. G., Pierson C., Venezia R., Yu V., Rihs J., Gorbach S. L.: National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob Agents Ch* 2007;51:1646-1655
12. Wybo I, van den Bossche D, Soetens O., Vekens E., Vandoorslaer K., Claeys G., Glupczynski Y., Ieven M., Melin P., Nonhoff C., Rodriguez-Villalobos H., Verhaegen J., Piérard D.: Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:155-161

13. Scotto d'Abusco A., del Grosso M., Censini S., Covacci A. and Pantosti A.: The alleles of the *bft* gene are distributed differently among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from human sources and can be present in double copies. *J Clin Microbiol* 2000;38:607-612
14. Nagy E., Maier T., Urban E., Terhes G. and Kostrzewa M.: Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(8):796-802
15. Szoke I., Dósa E. and Nagy E.: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Hungary. *Anaerobe* 1997;3:87-89

## A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

- I. **Károly Péter Sárvári**, József Sóki, Miklós Iván, Cecília Miszti, Krisztina Latkóczy, Szilvia Zsóka Melegh, Edit Urbán: MALDI-TOF MS versus 16S rRNA sequencing: minor discrepancy between tools in identification of *Bacteroides* isolates.  
**ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA**  
2017; Sept. 11:1-9 doi: 10.1556/030.64.2017.025. **IF: 0.921**
  
- II. **Károly Péter Sárvári**, József Sóki, Katalin Kristóf, Emese Juhász, Cecília Miszti, Krisztina Latkóczy, Szilvia Zsóka Melegh, Edit Urbán: A multicentre survey of antibiotic susceptibility of *Bacteroides* species from Hungary.  
**INFECTIOUS DISEASES** **Accepted** **IF: 1.119**
  
- III. **Károly Péter Sárvári**, József Sóki, Katalin Kristóf, Emese Juhász, Cecília Miszti, Krisztina Latkóczy, Szilvia Zsóka Melegh, Edit Urbán: Molecular characterization of Multidrug Resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples.  
**JOURNAL OF GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE** 2017 Oct 31. pii: S2213-7165(17)30207-2. doi: 10.1016/j.jgar.2017.10.020. [Epub ahead of print] PMID: 29101081  
**IF: 1.276**
  
- IV. **Károly Péter Sárvári**, József Sóki, Miklós Iván, Cecília Miszti, Krisztina Latkóczy, Szilvia Zsóka Melegh, Edit Urbán: Detection of enterotoxin and protease genes among Hungarian clinical *Bacteroides fragilis* isolates.  
**ANAEROBE** 2017;48:98-102 doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.07.005. **IF: 2.278**

## A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Karoly Peter Sarvari**, Szilard Zolyomi, Gergely Agoston, Gabriella Terhes, Henriette Gavalier, Tamas Forster, Albert Varga, Edit Urban: A rare case of acute myocarditis  
*J Med Microb Diagn* Open Access 2015, 4:3 **IF: 1.90**
  
- II. **Karoly Peter Sarvari**, Bela Vasas, Ildiko Kiss, Andrea Lazar, Istvan Horvath, Marianna Simon, Zoltan Peto, Edit Urban: Fatal *Clostridium perfringens* sepsis due to emphysematous gastritis and literature review  
*Anaerobe* 2016;40:31-34 **IF: 2.479**

**Kumulatív IF: 9.973**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként mindenekelőtt szeretném kifejezni őszinte hálámat és köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Urbán Edit Docens Asszonynak, aki folyamatosan támogatott és irányított a munka során.

Hálás vagyok kollégáimnak, Dr. Miszti Cecéliának, Dr. Kristóf Katalinnak, Dr. Juhász Emesének, Dr. Iván Miklósnak, Dr. Latkóczy Krisztinának és Dr. Melegh Szilvia Zsókiának, akik segítettek a törzsek gyűjtésében és rendelkezésre bocsájtották a szükséges adatokat.

Mély hálámat fejezem ki Dr. Sóki Józsefnek és Dr. Terhes Gabriellának a különböző molekuláris módszerek elsajátítása terén nyújtott segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Nagy Erzsébet részére a publikálás során a tőle kapott értékes tanácsokért.

Az SZTE ÁOK Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetének valamennyi munkatársa részére hálás vagyok segítő együttműködésükért, türelmükért és támogatásukért.

Mély hálámat fejezem ki Édesanyám, Barátnőm és Rokonaim számára, akik szeretetükkel támogattak a munkám éve során.

Köszönettel tartozom David P. Curley lektornak, aki a disszertáció angol nyelvi helyességét ellenőrizte.